

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：32403

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591492

研究課題名（和文）絶食時の廃用性腸管粘膜萎縮における誘導型及び神経型 NO 合成酵素の相互作用に関する研究

研究課題名（英文）The role of neuronal and inducible NOS in the regulation of intestinal apoptosis in fasting and refeeding rat.

研究代表者 内田 博之（UCHIDA HIROYUKI）

城西大学 薬学部・准教授

研究者番号：20245195

研究成果の概要（和文）：

絶食後再摂食における誘導型 NO 合成酵素(iNOS)と神経型(nNOS)の発現と役割を明らかにすること、および再摂食による廃用性腸管粘膜萎縮の回復が空腸の NOS 発現レベルと関係があるかどうかを明らかにすることを目的とした。nNOS 発現は絶食により低下し、iNOS 活性を上昇させ廃用性腸管粘膜萎縮を招き、一方、nNOS 発現は絶食後再摂食により上昇し、iNOS 活性を低下させ廃用性腸管粘膜萎縮を回復させた。nNOS は、iNOS 活性を調節し、アポトーシスの誘導を調節することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

To investigate the change and role of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS) on decreasing intestinal apoptosis of refeeding after fasting in rats and to define whether the recovery of the intestinal mucosa atrophy by refeeding is associated with the levels of nitric oxide synthases (NOSs) in the jejunum. These results suggest that nNOS-involved control might be present in the regulation of iNOS activity and its-mediated apoptosis in fasting and refeeding.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総 計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：廃用性腸管粘膜萎縮、絶食、再摂食、誘導型 NO 合成酵素、神経型 NO 合成酵素

1. 研究開始当初の背景と目的

腸管粘膜は陰窩の細胞増殖と絨毛のアポトーシスによって生理的に均衡が保たれており、絶食によって腸管粘膜は萎縮する。以前、著者らは絶食ラットに選択的 iNOS 阻害剤である aminoguanidine (AG)を投与し、絶食に

よる腸管粘膜萎縮における腸上皮細胞のアポトーシスの増加に iNOS を中心としたメカニズムが関与していることを明らかにしたが、絶食後再摂食による腸管粘膜の回復過程におけるこのメカニズムに対する影響については未知である。そこで、本研究では、再摂食による腸管粘膜の回復過程における

iNOS を介したアポトーシスの制御について明らかにすることを目的とした。また、nNOS 由来 NO は、腸管筋神経叢内の神経伝達物質として蠕動運動の制御に関与している。著者らは絶食による腸管粘膜萎縮における腸上皮細胞のアポトーシスが nNOS の減少と iNOS の増加を伴うことを報告した。本研究は、絶食後再摂食による腸管粘膜の回復過程においても、iNOS と nNOS の相互作用が寄与しているかどうかを明らかにする。

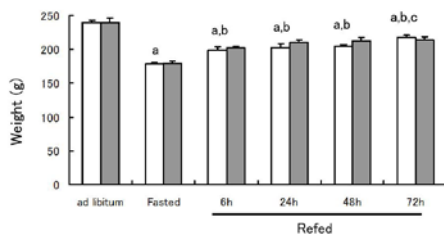
2. 研究の方法

雄性Wistarラットをそれぞれ生理食塩水 (SA) 投与群とAG投与群に分け、3 日間の絶食後に、再摂食を 0、6、24、48、72 時間行った。空腸を摘出し、病理組織標本 (HE染色、TUNEL染色) を作製した。また酸化窒素分析システムを使用して、空腸組織中のNO₂⁻の測定をし、RT-PCR法を用いてiNOSおよびnNOS、IFN- γ mRNAの測定をし、さらにELISA法を用いて 8-OHdGを測定し活性酸素種 (ROS) 産生の指標とした。

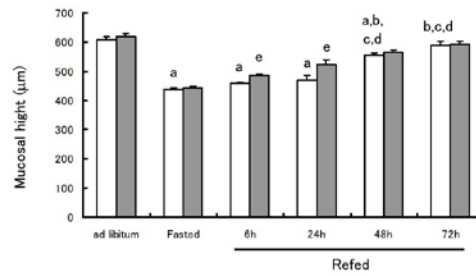
3. 研究の結果

絶食により腸上皮細胞のアポトーシスの増加に伴う腸粘膜の萎縮がみられ、その後の再摂食によってアポトーシスが減少し腸粘膜も伸長した。また絶食による iNOS mRNA 発現の増加に伴い、NO₂⁻の産生が増加するとともに、ROS の産生および IFN- γ mRNA の発現も増加し、その後の再摂食によって減少した。さらに、AG の投与によって再摂食の早期段階 (6、24 時間) において有意な腸上皮細胞のアポトーシスの減少と腸粘膜高の伸長、および空腸組織中の NO₂⁻、ROS の産生が有意に減少した。摂食群に比べて再摂食 0 時間群では腸粘膜の萎縮に伴い、nNOS mRNA および腸管筋神経叢内における nNOS タンパクの発現が有意に低下し、また同時に iNOS mRNA および絨毛における iNOS タンパクの発現が有意に増加した。さらに、その後の再摂食による腸粘膜の伸長に伴い、nNOS の発現は増加し、iNOS の発現は抑制された。また、AG による nNOS の発現に対する影響はみられなかったが、再摂食の早期段階における iNOS タンパクの発現が減少した。

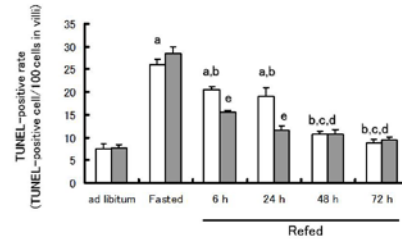
Body weight changes at the refeeding periods in SA-treated rats and AG-treated rats.



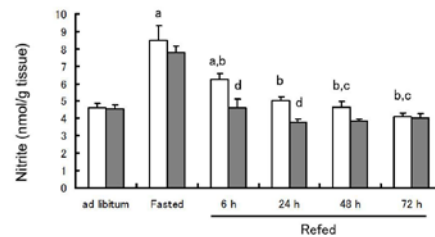
Effect of refeeding after fasting and AG treatment on jejunal mucosal height



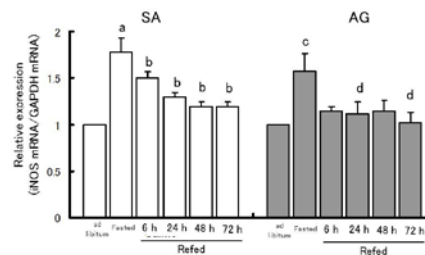
Effect of refeeding after fasting and AG treatment on TUNEL-positive rate in the jejunal villus.



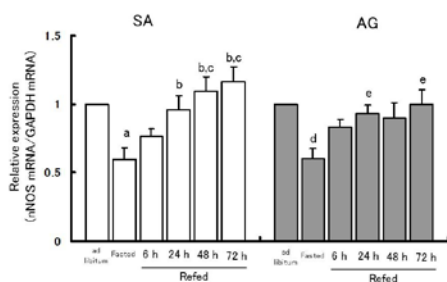
Effect of refeeding after fasting and AG treatment on nitrite concentration in the jejunum.



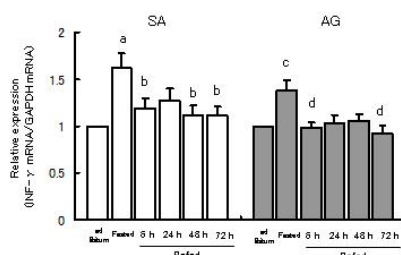
Effect of refeeding after fasting and AG treatment on jejunal expression of iNOS mRNA



Effect of refeeding after fasting on jejunal expression of nNOS mRNA.



Effect of fasting and AG treatment on jejunal expression of IFN- γ mRNA.



4. 研究成果

絶食による腸管粘膜萎縮は、腸管腔からの機械的刺激の欠如による蠕動運動の消失に伴う腸管筋神経叢内の nNOS の減少が、腸上皮細胞の iNOS 発現の誘導を導いたことから生じる可能性が示唆された。また、ラット腸管粘膜の恒常性の制御には iNOS を介したメカニズムが中心的な役割を果たしている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

・J Ito, H Uchida, et.al. Fasting-induced intestinal apoptosis is mediated by inducible nitric oxide synthase and interferon- γ in rat. Am J Physiol Gastrointest liver Physiol. 298, 2010, 916-926

〔学会発表〕(計 4 件)

・内田博之、伊東順太ら。絶食後再摂食ラットの腸管粘膜における神経型および誘導型 NO 合成酵素の相互作用 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 グランシップ (静岡県)
 ・伊東順太、内田博之ら。再摂食による腸管粘膜の回復過程における誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) によるアポトーシスの制御 日本薬学会第 131 年会 2011 年 3 月 グランシップ

(静岡県)

・Ito J, Uchida H, et.al. The role of neuronal and inducible NOS in the regulation of intestinal apoptosis in fasting and refeeding rat. The 6th international conference on the biology, chemistry, and therapeutic applications of nitric oxide. June, 2010. Kyoto international conference center (Kyoto, Japan)

・町田保奈美、内田博之ら。酸化ストレスを介した絶食時の腸管粘膜萎縮に対するグルタミンの予防効果. 日本薬学会 2013 年 3 月 横浜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 博之 (UCHIDA HIROYUKI)

城西大学 薬学部・准教授

研究者番号: 20245195

(2) 研究分担者

大竹 一男 (OTAKE KAZUO)

城西大学 薬学部・助教

研究者番号: 50337482

(3) 研究分担者

明海大学 歯学部・助教

研究者番号: 40609096